

0718231-1

На правах рукописи

Салихова Зифа Закарьевна

**НУКЛЕАЗА И ФОСФАТАЗА *PROTEUS MIRABILIS*.
СИНТЕЗ, ЛОКАЛИЗАЦИЯ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И
ЭНЗИМАТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА**

03.00.07- микробиология

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

КАЗАНЬ - 2000

Работа выполнена в лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов
Казанского государственного университета им. В.И. Ульянова-Ленина

Научный руководитель: кандидат биологических наук, вед.
научн. сотр. Юсупова Д.В.

Научный консультант: доктор биологических наук, академик
АН РТ Лещинская И.Б.

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Госманов Р.Г.;
кандидат биологических наук, доцент
Амерханова Н. Н.

Ведущая организация: Казанский институт биохимии и
биофизики КНЦ РАН (г. Казань)

Защита диссертации состоится «26» октября 2000 г. в 14³⁰
часов на заседании Диссертационного совета К.053.29.19 при Казанском
государственном университете им. В.И. Ульянова-Ленина (420008, г. Казань,
ул. Кремлёвская, 18)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского
государственного университета

Автореферат разослан 20 сентября 2000 г.

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА
КФУ



0000947790

Ученый секретарь Диссертационного
совета, кандидат биологических наук

Аскарлова А.Н.

Актуальность проблемы. Изучение ферментных систем патогенных и условно-патогенных микроорганизмов и регуляции экспрессии кодирующих их генов представляет интерес как для выяснения патогенеза инфекционного процесса и управления им, так и для более полного представления о физиологии и факторах вирулентности бактерий.

До настоящего времени наши сведения о ферментах патогенных бактерий ограничены. Это справедливо и в отношении нуклеаз - ферментов, вызывающих деградацию таких жизненно важных компонентов клетки, как нуклеиновые кислоты.

Нуклеазы, несомненно, играют роль в патогенезе бактериальных инфекций. Большинство патогенных бактерий, продуцирующих экзотоксины, как правило, выделяют в среду большие количества нуклеаз. В основном это ферменты с эндонуклеолитическим типом действия на ДНК или одновременно на ДНК и РНК - эндонуклеазы (Беляева с соавт., 1974; Лещинская, 1975; Юсупова, 1978; Лещинская с соавт., 1991). Секретция этих ферментов в среду нередко коррелирует с вирулентностью и токсигенностью бактерий (Юсупова, 1978). Имеющиеся данные позволяют рассматривать ДНКазы и эндонуклеазы патогенных бактерий как фактор, способствующий проникновению бактерий в ткани и распространению по организму. Результаты изучения механизма действия колицинов E2 и E3 говорят о том, что нуклеазы могут выполнять роль факторов агрессии и вызывать разрушение и гибель клетки при условии проникновения в нее (Garinotschneider et al., 1997).

У патогенных и условно-патогенных представителей семейства *Enterobacteriaceae*, не продуцирующих экзотоксины, как правило, нуклеазы в среду не выделяются. Можно предположить, что у этих бактерий нуклеазы локализуются в периплазме и, также как и эндотоксин, выделяются в среду при разрушении микробной клетки и проявляют свое действие в комплексе с эндотоксином.

Кроме того, несмотря на хорошую изученность биохимических и физико-химических свойств отдельных секретируемых эндоДНКаз и эндонуклеаз патогенных и сапрофитных бактерий, до настоящего времени имеется недостаточно данных о регуляции экспрессии генов этих ферментов. Исключение составляет эндонуклеаза *Serratia marcescens*. Было показано, что биосинтез внеклеточной эндонуклеазы *Serratia marcescens* индуцируется соединениями, блокирующими репликацию ДНК, индукто-

рами SOS-функций клетки (Юсупова с соавт., 1990), и что для экспрессии гена эндонуклеазы *Serratia marcescens* необходим белок RecA (Ball et al., 1990).

В культуральной жидкости и бесклеточных экстрактах *Proteus mirabilis* была обнаружена активность ДНКазы и РНКазы. Изучены некоторые свойства ферментов, выделенных из клеток *Proteus mirabilis* (Center, Behal, 1968, 1968a,b; Goebel, Helinski, 1971, 1971a). Ферменты с высокой удельной активностью легко освобождались в среду при обработке клеток многократным быстрым замораживанием-оттаиванием, что предполагает локализацию их в периплазме (Соколова с соавт., 1976).

Цель и задачи исследования. Целью данной работы было установление локализации, регуляции синтеза, а также характеристика свойств нуклеаз *Proteus mirabilis* - возможных факторов вирулентности бактерий. В связи с поставленной целью планировалось решить следующие задачи:

1. Изучить уровень нуклеазной активности в культуральной жидкости и бесклеточных экстрактах различных штаммов *Proteus mirabilis*.
2. Провести сравнительный анализ нуклеазной активности *Proteus mirabilis* и других представителей энтеробактерий.
3. Установить локализацию нуклеаз, обнаруженных в бесклеточных экстрактах.
4. Установить состав белков с нуклеазной активностью в культуральной жидкости и периплазме *Proteus mirabilis*.
5. Изучить динамику синтеза и секреции нуклеаз при изменении физиологического состояния клеток в процессе роста бактерий.
6. Разработать эффективные методы получения и очистки нуклеазы, обнаруженной в культуральной жидкости и периплазме.
7. Изучить свойства очищенного фермента.
8. Исследовать механизмы регуляции биосинтеза эндонуклеазы.
9. В качестве контрольного фермента на всех этапах работы исследовать типичный периплазматический фермент - щелочную фосфатазу *Proteus mirabilis*.

Научная новизна работы. Впервые в сравнительном плане проведено исследование активности нуклеаз бактерий рода *Proteus* и других представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Показано наличие невысокой ДНКазной и РНКазной активности в культуральной жидкости и высокого уровня активности ферментов в периплазме у

различных штаммов *Proteus mirabilis*. Впервые показано, что в культуральной жидкости и периплазме *P.mirabilis* фермент обнаруживается в виде двух изоформ, обладающих ДНКазной и РНКазной активностью одновременно. Разработана схема получения и очистки нуклеазы, описаны основные свойства фермента. Показано, что фермент обладает эндонуклеолитическим типом действия на ДНК, имеет оптимум pH - 10 и требует для проявления активности ионы двухвалентных металлов. Фермент обозначен как неспецифическая эндонуклеаза. Выявлено, что эндонуклеаза синтезируется в период замедления роста бактерий. Впервые показана индукция синтеза и секреции эндонуклеазы *Proteus mirabilis* под влиянием митомицинаС, классического индуктора SOS-функций клетки. Показано, что в периплазме *Proteus mirabilis* обнаруживается один белок с активностью щелочной фосфатазы, активность и синтез фермента ингибируются неорганическим фосфатом, биосинтез фермента и секреция в среду, также как и биосинтез и секреция эндонуклеазы, индуцируется митомициномС. Накопление фермента в периплазме происходит в период перехода к стационарной фазе роста и в стационарную фазу роста бактерий.

Практическая ценность работы. Результаты, полученные в данной работе, могут быть использованы в лабораторной диагностике, при разработке систематики и классификации энтеробактерий в эволюционном плане. Разработанная схема получения и очистки эндонуклеазы может быть использована при получении фермента в препаративных количествах для структурно-функциональных исследований.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы были доложены на итоговых научных конференциях КГУ за 1995 и 1998 годы, на XI Всероссийской конференции “Ферменты микроорганизмов’98” (г. Казань, 1998), на II Всероссийской конференции “Гомеостаз и инфекционный процесс” (г. Саратов, 1998) и на международной конференции студентов и аспирантов “Ломоносов - 2000” (г. Москва, 2000).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 139 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы (3 главы), материалы и методы исследования, результаты исследования (8 глав), обсуждение результатов, выводы, литература (всего 210 источников, в том числе 148 иностранных авторов). Работа иллюстрирована 14 таблицами и 28 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Использованные штаммы бактерий. В работе использованы: штаммы рода *Proteus*, полученные из различных коллекций микробиологических лабораторий клинических больниц г. Казани; представители родов *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Hafnia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Morganella*, *Providencia*, полученные из Казанского НИИ эпидемиологии и микробиологии. Основные исследования проведены при использовании *Proteus mirabilis* штамм 4, выделенного из гнойного патологического материала.

Культивирование бактерий. Бактерии выращивали в инкубационном шкафу-качалке при 200 об/мин и температуре 37°C. В работе использовали следующие среды: МПБ, ТВУ (Eiter et al., 1981) и низкофосфатную среду (Знаменская с соавт., 1982). В кратковременных опытах с культурой отмытых клеток бактерии, выращенные в течение 20-ти часов, осаждали центрифугированием, отмывали 0.14 М раствором NaCl и ресуспендировали в среде того же состава, сохраняя исходную концентрацию клеток. Оптическую плотность измеряли на ФЭК "Spectromom-410" (Венгрия), принимая за единицу биомассы $D_{1\text{см}}^{650}$; число колониеобразующих единиц (КОЕ) определяли посевом на чашки с МПА (4% агара), вес сухой биомассы - высушиванием при 105°C до постоянного веса; белок определяли по Лоури, ДНК - по Бартону (Burton, 1956). Удельную скорость роста рассчитывали по Перту (1980), удельную скорость синтеза фермента - по аналогии с удельной скоростью роста. Клетки разрушали дезинтеграцией ультразвуком на установке УЗДН-1 (Россия). В работе использовали методы избирательного освобождения ферментов периплазмы, включающие попеременное многократное быстрое замораживание-оттаивание (МБЗО) жидким азотом (Соколова с соавт., 1976); обработку хлороформом (Ames G.F.-L. et al., 1984); медленное замораживание-оттаивание и быстрое замораживание-оттаивание (Lall S.D. et al., 1989).

Сферопласты получали по методу Нью и Хеппеля (New, Heppel, 1964).

ДНКазную и РНКазную активность определяли по образованию кислоторастворимых продуктов расщепления НК (Татарская с соавт., 1966; Anfinsen et al., 1954); **активность фосфатазы** - по расщеплению модельного субстрата - п-нитрофенилфосфата натрия. (Лещинская с соавт., 1980); **активность протеазы** - видоизмененным методом Ансона (Каверзнева, 1976). О наличии **гемолитической ак-**

тивности судили по образованию зон гемолиза на чашках с кровяным МПА. **Лецитиназную активность** определяли на чашках с желточно-спиртовым агаром (Керашева, Притчина, 1974). **Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы** определяли по Кочетову (Кочетов, 1980).

Электрофорез белков проводили в 7 и 12.5% ПААГ в нативных и денатурирующих условиях по Лэммли (Laemmli, 1970). По окончании электрофореза проводили субстратный блоттинг с целью обнаружения белков с фосфатазной, ДНКазной и РНКазной активностью.

Выделение и очистка нуклеазы. ДЭАЭ - и КМ-целлюлозы обрабатывали по общепринятой методике (Остерман, 1985) и уравнивали 0.01М Na-ацетатным буфером, pH 6.3 (КМ-целлюлоза) и 0.01М трис-HCl буфером, pH 8.5 (ДЭАЭ-целлюлоза). Сефадексы G100 и G25 готовили по Детерману (1970) и уравнивали 0.01М Na-ацетатным буфером, pH 6.3 (G100) и 0.01М трис-HC буфером, pH 7.8 (G25). Для получения фермента бактерии выращивали на агаризованной среде TBY (Eiter et al, 1981) при 37°C. Бесклеточные экстракты получали методом многократного замораживания-оттаивания клеток и использовали в качестве исходного материала для очистки фермента.

Определение свойств нуклеазы. При определении pH-оптимума действия фермента использовали 0.2М буферные растворы: глицин-HCl, трис-ацетат, трис-HCl, глицин-NaOH при 37°C. Термостабильность фракции очищенного фермента определяли в диапазоне температур 40 - 90°C в течение 10 - 60 минут. При изучении влияния ионов двухвалентных металлов на активность нуклеазы ферментный препарат обессоливали на колонке с сефадексом G25. Характер действия нуклеазы изучали, сравнивая кинетику падения вязкости раствора ДНК с накоплением кислоторастворимого материала, а также методом, рекомендованным для оценки топоизомеразной активности микоплазм (Horovitz et al., 1996).

Роящиеся формы вегетативных клеток *P.mirabilis* получали по методу, описанному Аллисоном (Allison et al., 1992).

Математическую обработку результатов проводили по Плохинскому (1978).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Нуклеазная и фосфатазная активность *Proteus mirabilis*

Исследованы нуклеазная и фосфатазная активность бесклеточных экстрактов и культуральной жидкости восьми штаммов *P. mirabilis*. У всех изученных штаммов в культуральной жидкости обнаруживаются невысокая ДНКазная, РНКазная активность и активность щелочной фосфатазы. Анализ ферментативной активности бесклеточных экстрактов показал, что они обладают высокой ДНКазной, РНКазной и фосфатазной активностью. Доля внеклеточной активности от суммарной, обнаруженной в культуральной жидкости и бесклеточных экстрактах, составляла для ДНКазы - 11 - 19%, для РНКазы - 4 - 14% и для фосфатазы - 1.2 - 21% в зависимости от штамма. Эти данные свидетельствуют о том, что *P. mirabilis* в процессе роста выделяет в среду незначительные количества ферментов, основная часть ферментов находится, по-видимому, в периплазме, что согласуется с данными литературы, согласно которым у грамотрицательных бактерий секрета ферментов в среду бывает относительно редко (Прист, 1987).

Сравнение ферментативной активности различных представителей энтеробактерий показало, что бактерии родов *Proteus*, *Providencia* и *Morganella* обладают повышенным уровнем активности нуклеаз и фосфатазы (таблица). Для дальнейшей работы

Таблица

Активность ферментов в бесклеточных экстрактах и культуральной жидкости представителей семейства кишечных бактерий. Время культивирования - 24 ч.
Среда культивирования - МПБ.

Род бактерий	Число штаммов	Бесклеточный экстракт, %			Культуральная жидкость, %		
		на ДНК	на РНК	фосфатаза	на ДНК	на РНК	фосфатаза
<i>Escherichia</i>	15	2.3	39.0	40.0	27.6	18.9	32.0
<i>Shigella</i>	8	4.8	47.1	45.2	44.8	14.9	16.0
<i>Salmonella</i>	9	38.9	94.2	7.5	33.6	83.8	12.0
<i>Citrobacter</i>	10	0.4	65.8	6.3	70.7	2.7	1.2
<i>Klebsiella</i>	10	0.1	49.7	157.5	43.9	0	88.0
<i>Enterobacter</i>	10	0.9	11.1	8.8	27.6	83.8	20.0
<i>Hafnia</i>	6	0.7	17.9	18.8	54.3	21.6	24.0
<i>Proteus</i>	12	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
<i>Morganella</i>	1	49.5	11.7	186.3	56.9	67.6	280.0
<i>Providencia</i>	2	112.2	22.3	250.0	63.8	2.7	216.0

был отобран штамм *P.mirabilis*4, выделенный из гнойного содержимого раны, отличающийся высоким уровнем нуклеазной активности в бесклеточном экстракте. Морфологические, культурально-биохимические свойства штамма типичны для *P.mirabilis*.

Исследование локализации ферментов *P.mirabilis*4 показало, что до 70% обнаруженной в бесклеточных экстрактах ДНКазной, 27% РНКазной и более 60% фосфатазной активности освобождается в среду при образовании сферопластов, т.е. локализовано в периплазме. Оставшаяся часть обнаруживается при разрушении сферопластов. Можно предположить, что они связаны либо с цитоплазматической мембраной, либо с цитоплазмой клетки. Электрофорез в 12.5% ПААГ в денатурирующих условиях белков периплазмы и цитозоля обнаружил наличие во фракции периплазмы 20 белков с молекулярными массами от 60 до 10 кДа, среди которых доминировали белки с молекулярными массами 57, 53, 46, 38, 34 и 13 кДа.

Сравнительное изучение четырех различных методов, рекомендованных для избирательного освобождения ферментов, локализованных в периплазме грамотрицательных бактерий, показало, что для этих целей при работе с клетками *P.mirabilis* наиболее эффективен метод многократного замораживания-оттаивания клеток. В бесклеточных экстрактах, полученных при использовании этого метода, отсутствовали ферменты цитоплазмы и ДНК, что свидетельствовало о том, что цитоплазматическая мембрана осталась ненарушенной. При использовании этого метода простым отделением белков периплазмы от остальных клеточных белков достигалась двукратная очистка интересующих нас ферментов. Использование метода многократного замораживания-оттаивания, обеспечивающего освобождение периплазматических ферментов, существенно облегчило дальнейшее выделение и очистку нуклеазы. Далее в работе нами использовались бесклеточные экстракты, полученные этим методом, и обозначенные как белки периплазмы. В работе подобраны также условия обработки клеток *P.mirabilis* ультразвуком, дающие полное разрушение клеток.

Электрофорез в 7.5% ПААГ с последующим блоттингом на 1% агарозном геле, содержащем ДНК, РНК или п-нитрофенилфосфат Na показал, что в культуральной жидкости и в материале периплазмы обнаруживается один белок с активностью щелочной фосфатазы с Rf 0.35 и два белка, обладающие одновременно ДНКазной и

РНКазной активностью. Rf белков культуральной жидкости составляет 0.17 и 0.26, в бесклеточном же экстракте - первый белок остается на старте, Rf второго белка составляет 0.09, то есть оба белка обладают меньшей электрофоретической подвижностью, чем белки культуральной жидкости. Возможно, два белка с нуклеазной активностью, обнаруженные в периплазме и культуральной жидкости, представляют собой две изоформы одного фермента, обладающего одновременно ДНКазной и РНКазной активностью - нуклеазы, которые в значительном количестве накапливаются в периплазме и в незначительном количестве секретируются в среду, а изменения в значениях Rf связаны с процессингом белков в период пересечения ими наружной мембраны. По-видимому, в культуральной жидкости и периплазме *P.mirabilis* ДНКазная и РНКазная активность принадлежат одному и тому же белку. Далее при определении активности нуклеазы в качестве субстрата использовали ДНК.

2. Зависимость биосинтеза ферментов от физиологического состояния клеток по фазам роста *Proteus mirabilis* 4

Исследование динамики синтеза и секреции в среду нуклеаз и фосфатазы *P.mirabilis* в зависимости от физиологического состояния клеток в процессе роста бактерий показало, что наиболее высокая скорость синтеза и секреции в среду нуклеазы наблюдается в период перехода к стационарной фазе, когда клетки перестают делиться. В экспоненциальной фазе роста биосинтез фермента отсутствует, а уровень фермента в культуральной жидкости низкий (рис.1). Динамика изменения РНКазной активности в культуральной жидкости и периплазме в процессе роста *P.mirabilis* была идентична динамике ДНКазной активности. Динамика накопления нуклеазы по фазам роста *P.mirabilis* аналогична динамике синтеза эндонуклеазы I *E.coli*, локализованной в периплазме, (Shortman, Lehman, 1964) и динамике накопления эндонуклеазы *Serratia marcescens* (Юсупова с соавт., 1993). Синтез и секреция в среду щелочной фосфатазы по фазам роста культуры отличается от синтеза и секреции в среду нуклеазы. Удельная активность фосфатазы в культуральной жидкости и периплазме увеличивается в стационарную фазу роста (рис.2). Необходимо отметить, что биосинтез фермента и секреция его в среду индуцируется на среде с низким содержанием неорганического фосфата (P_i).

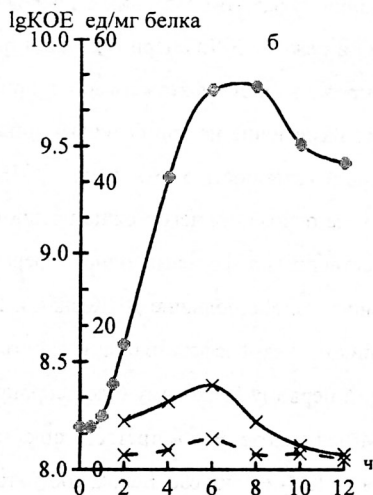
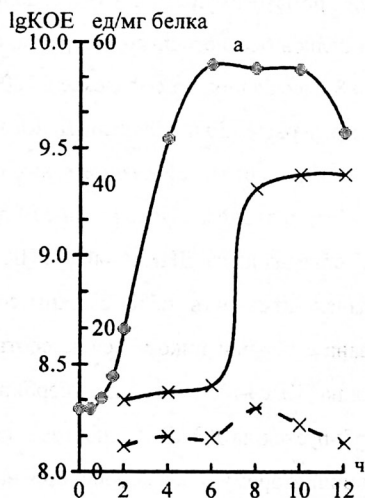


Рис.1. Рост (-●-●-●-) и накопление нуклеазы (-х-х-х-) *Proteus mirabilis* в культуральной жидкости (---) и периплазме (—) на разных средах. а - МПБ; б - низкофосфатная среда.

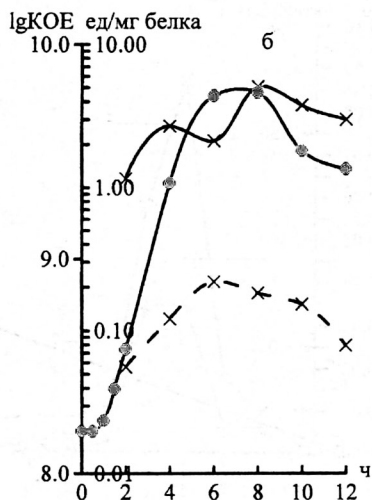
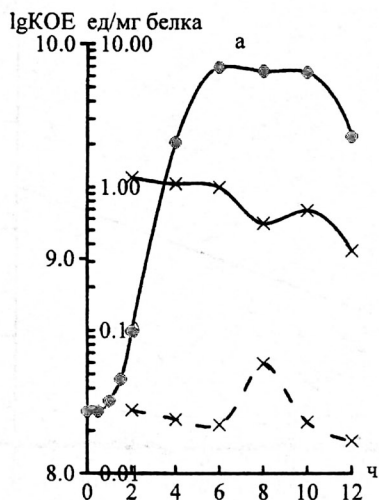


Рис.2. Рост и накопление фосфатазы *Proteus mirabilis* в культуральной жидкости и периплазме на разных средах. Обозначения как на рис.1

3. Выделение и очистка нуклеазы *Proteus mirabilis* 4

Нуклеаза из бесклеточного экстракта очищена методом ступенчатого фракционирования сульфатом аммония с последующей хроматографией на КМ-целлюлозе и МоноQ в режиме FPLC. При гель-фильтрации белков бесклеточного экстракта, сконцентрированных сульфатом аммония при 0.4-0.8 насыщения, на сефадексе G100 произошло разделение на три белковых пика. Все белковые пики обладали ДНКазной и РНКазной активностью, отношение ДНКазной активности к РНКазной в них равно 2.4-2.5, на основании чего можно предполагать, что в данном случае мы имеем дело с множественными формами одного фермента, обладающего ДНКазной и РНКазной активностью. Наибольшие ДНКазная и РНКазная активность (65%) связаны со вторым пиком, вся фосфатазная активность связана с первым пиком. Белок, соответствующий первому белковому пику, сорбируется на ДЭАЭ-целлюлозе и не сорбируется на КМ-целлюлозе. Белок третьего пика не сорбируется на ДЭАЭ-целлюлозе и сорбируется на КМ-целлюлозе. Белок, соответствующий второму пику, сорбируется на КМ-целлюлозе при pH 6.0 и ДЭАЭ-целлюлозе при pH 8.5. ДНКазная и РНКазная активность второго пика элюировались с КМ-целлюлозы одновременно при концентрации NaCl 0.14M

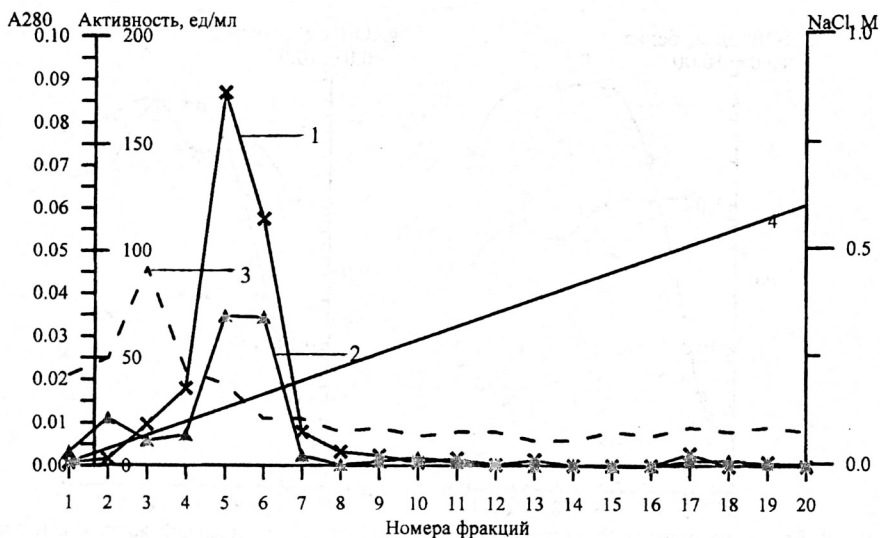


Рис.3 Хроматографический профиль периплазматической нуклеазы *Proteus mirabilis* 4 на колонке с КМ-целлюлозой. 1 - активность на ДНК; 2 - активность на РНК; 3 - A₂₈₀; 4 - градиент NaCl.

(рис.3). Таким образом удалось освободить нуклеазу от сопутствующих белков и фосфатазы. Соотношение ДНКазной и РНКазной активности равно 2.5. Фермент очищен в 190 раз и имел удельную активность ДНКазы - 7520, РНКазы - 2900 единиц. Электрофорез в ПААГ белкового препарата, полученного после очистки на КМ-целлюлозе, с последующим блоттингом на 1% агарозе с ДНК или РНК показал наличие белка с ДНКазной и РНКазной активностью на старте.

В дальнейшем была предпринята дополнительная хроматографическая очистка с помощью сильных ионообменников в системе FPLC. При использовании сильного анионообменника МоноQ, белок не вымывался с колонки при промывке её уравнивающим буфером, и элюировался при ионной силе 0.14М NaCl одним пиком, содержащим как ДНКазную, так и РНКазную активность (рис.4). На основании полученных результатов разработана схема очистки нуклеазы *P.mirabilis*4, дающая возможность получить препарат фермента в электрофоретически гомогенном состоянии, представленная на рисунке 5.

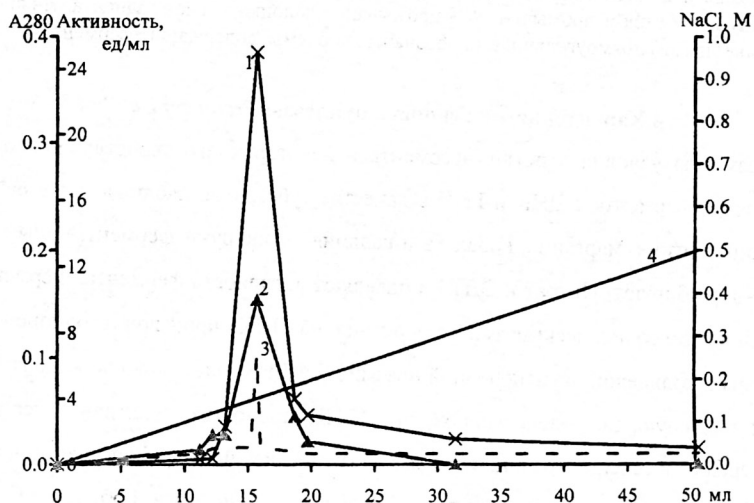


Рис.4 Хроматографический профиль нуклеазы *Proteus mirabilis*4 на колонке MonoQHR 5/5 в режиме FPLC. Обозначения как на рис.3.



Рис.5 Схема выделения и очистки периплазматической нуклеазы *Proteus mirabilis*. Прямоугольниками условно показаны градиенты элюирующих буферов. Над ними цифрами указаны исходные и конечные молярности элюирующих растворов. L - соответствует этапу нанесения и промывки. W - промывание колонки после градиента. Нижними (заполненными) прямоугольниками обозначены объемы, содержащие фермент.

4. Характеристика свойств нуклеазы *Proteus mirabilis*

Изучены условия действия фермента и некоторые его свойства: максимальная активность фермента с ДНК и РНК в качестве субстратов наблюдается в районе pH 10. Ионы магния, марганца, кобальта и кальция активируют фермент, ионы железа и меди - ингибируют. Цитрат и ЭДТА подавляют активность фермента. Фермент обладает эндонуклеолитическим типом действия на ДНК, производит одноцепочечные разрывы в кольцевой двуцепочечной плазмидной ДНК, одинаково хорошо гидролизует как нативную, так и денатурированную ДНК, полностью инактивируется при температуре 60° в течение 10 мин. Фермент обозначен как неспецифическая эндонуклеаза и по свойствам похож на эндонуклеазу I *P. mirabilis*, описанную Гобелем и Гелинским (Goebel., Helinski, 1971a, б), но отличается наличием РНКазной активности.

5. Механизмы регуляции биосинтеза эндонуклеазы и фосфатазы

Proteus mirabilis

С целью выяснения возможных механизмов регуляции биосинтеза эндонуклеазы и фосфатазы изучалось влияние на биосинтез ферментов неорганического фосфата, субстратов ферментов, митомидинаС - индуктора SOS-функций клетки и превращения вегетативных клеток в роящиеся формы.

Биосинтез эндонуклеазы и фосфатазы индуцируется субстратами фермента - ДНК и РНК - и биосинтез нуклеазы незначительно подавляется (на 50%) высокими концентрациями неорганического фосфата. В отличие от эндонуклеазы, биосинтез и секреция в среду фосфатазы *P.mirabilis* ингибируется неорганическим фосфатом, как и в случае большинства фосфатаз бактерий (Шарипова с соавт., 1998; Torriani. 1960) (рис.6). Неорганический фосфат ингибирует активность фосфатазы *P.mirabilis*, не влияя на активность нуклеазы.

Исследование влияния митомидинаС на биосинтез и секрецию эндонуклеазы и фосфатазы *P.mirabilis* показало, что под влиянием митомидинаС увеличивается суммарная (культуральной жидкости + фракция периплазмы) ДНКазная, РНКазная и фосфатазная активность в среднем в три-четыре раза. В присутствии митомидинаС резко повышается уровень ДНКазной и РНКазной активности в культуральной жидкости

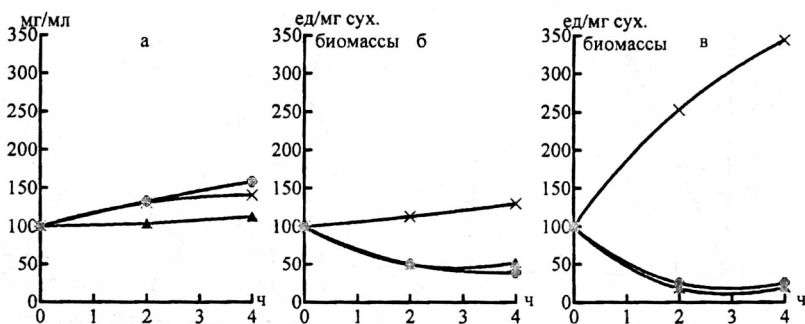


Рис.6 Изменение содержания белка (а), активности нуклеазы (б) и фосфатазы (в) (в%) в кратковременной культуре отмытых клеток *P.mirabilis*4, на среде с низким содержанием P_i (-x-x-x-), на среде, содержащей 5мг% P_i (-●-●-●-) и на среде с низким уровнем P_i , содержащей 10 мг/мл хлорамфеникола (-▲-▲-▲-). Контроль - показатели в нулевое время.

(в 200 и более раз), что сопровождается незначительным увеличением уровня активности в периплазме (рис.7). Удельная фосфатазная активность в культуральной жидкости также повышается в 70 раз. Хлорамфеникол, ингибитор белкового синтеза, внесенный в среду вместе с митомисиномС, подавляет увеличение активности ферментов, индуцируемое митомисиномС. Это свидетельствует о том, что увеличение активности ферментов в культуральной жидкости и периплазме связано с биосинтезом ферментных белков *de novo*. Таким образом, митомисинС индуцирует синтез и секрецию в среду эндонуклеазы и фосфатазы *P.mirabilis*. Вновь синтезируемые ферменты секретируются в культуральную жидкость, в то время как уровень активности ферментов в периплазме изменяется незначительно, практически сохраняясь на постоянном уровне. Усиленная секреция эндонуклеазы в культуральную жидкость может быть результатом ее сверхсинтеза, как показано, например, для щелочной фосфатазы *E.coli* (Несмеянова, 1990). С другой стороны, возможно, что, подобно ферменту пуллуоназе *Klebsiella oxytoca* (Pugsley, 1993), промоторные участки двух оперонов, включающих гены, ответственные за секрецию фермента, и структурные гены,

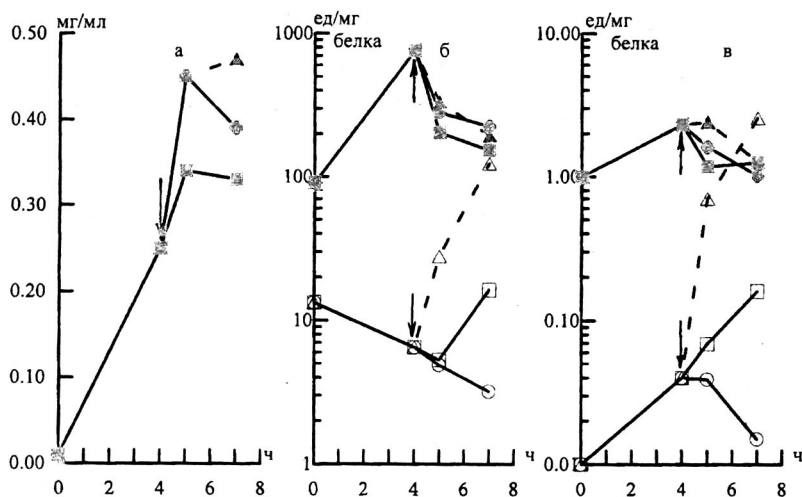


Рис. 7 Изменение содержания белка клеток (а) и удельной нуклеазной (б) и фосфатазной (в) активности при внесении в среду через 4 часа выращивания (конец экспоненциальной фазы роста) МС и ХФ. Стрелками указан момент внесения МС. Незаштрихованными символами обозначены ферменты культуральной жидкости, заштрихованными – ферменты периплазмы. -○-○- - контрольная среда; -Δ-Δ- - среда, содержащая МС; -□-□- - среда, содержащая МС и ХФ.

перекрываются и регулируются одним белком. В результате усиление синтеза фермента сопровождается усилением секреции его в окружающую среду. Индукция функций клетки под влиянием митомидина является одним из доказательств участия в этом процессе SOS-системы клетки (Тарасов, 1982; Беляков с соавт., 1987). Полученные результаты по индукции синтеза и секреции эндонуклеазы *P. mirabilis* под влиянием митомидина делают возможным предположение, что эндонуклеаза *P. mirabilis*, так же как эндонуклеаза *Serratia marcescens*, регулируется SOS-системой клетки.

Отличительным признаком *Proteus* является способность к дифференцировке вегетативных клеток в гипержгутиковые роящиеся формы. Роящиеся клетки отличаются повышенным синтезом уреазы, протеазы и гемолизина - основных факторов вирулентности *P. mirabilis* (Allison et al., 1992). Предполагается, что здесь имеет место координированная экспрессия физически разобщенных генов, кодирующих факторы вирулентности под транскрипционным контролем центрального регуляторного локуса. Анализ содержания белка, ДНКазной, РНКазной и фосфатазной активности в полученных бесклеточных экстрактах вегетативных и роящихся клеток показал, что при дифференцировке клеток из вегетативных в роящиеся, удельная активность эндонуклеазы и фосфатазы не изменяется.

ВЫВОДЫ

1. Уровень нуклеазной и фосфатазной активности в клетках *Proteus mirabilis* намного превышает уровень активности аналогичных ферментов у других исследованных видов семейства энтеробактерий.

2. Нуклеаза и фосфатаза локализованы в периплазме *P. mirabilis*, выделяются в среду при образовании сферопластов и при многократном быстром замораживании-оттаивании клеток. Внеклеточная активность ферментов составляет 11-19% от суммарной активности в клетках и культуральной жидкости.

3. Электрофоретический анализ показал наличие в периплазме и культуральной жидкости *P. mirabilis* двух изоформ нуклеазы и одной фосфатазы.

4. Нуклеаза и фосфатаза синтезируются клетками в период перехода к стационарной фазе роста и в стационарную фазу роста.

5. Разработан метод очистки периплазматической нуклеазы *P. mirabilis*, включающий хроматографию на КМ-целлюлозе и на колонке MonoQ в режиме FPLC, дающий возможность получить нуклеазу в электрофоретически гомогенном состоянии.

6. Фермент обладает эндонуклеолитическим типом действия, имеет оптимум pH 10, активируется ионами двухвалентных металлов, ингибируется ЭДТА, не ингибируется неорганическим фосфатом, гидролизует ДНК и РНК и обозначен как неспецифическая эндонуклеаза Pm.

7. Регуляция биосинтеза эндонуклеазы осуществляется нуклеиновыми кислотами по типу субстратной индукции и неорганическим фосфатом (негативная регуляция). Последний ингибирует синтез и активность фосфатазы. Синтез и секреция изучаемых ферментов индуцируется митомацином C — индуктором SOS-функций клетки, что свидетельствует об участии белков SOS-системы в регуляции синтеза внеклеточных ферментов *Proteus mirabilis*.

8. Синтез эндонуклеазы и щелочной фосфатазы *Proteus mirabilis* не индуцируется при дифференцировке вегетативных клеток в роящиеся формы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Ахметзянова З.З.**, Соколова Р.Б., Юсупова Д.В. Влияние митомицина С на биосинтез гидролитических ферментов у *Proteus mirabilis*// Деп. В ВИНТИ 30.08.95, № 2514-B95.- С.1-14.

2. **Салихова З.З.**, Сафина Д.Р., Соколова Р.Б., Юсупова Д.В. Биосинтез дезоксирибонуклеазы *Proteus mirabilis*. В сборн. "Ферменты микроорганизмов", Казань, 1998.- С. 50 - 58.

3. **Салихова З.З.** Влияние неорганического фосфата и нуклеиновых кислот на биосинтез ДНКазы, РНКазы и щелочной фосфатазы *Proteus mirabilis*// Деп. В ВИНТИ 19.03.98, № 765-B98.- С.1-13.

4. **Салихова З.З.**, Пономарева А.З., Сафина Д.Р. Использование различных методов освобождения периплазматических ферментов для получения ДНКазы, РНКазы и щелочной ФМЭ *Proteus mirabilis*// Деп. В ВИНТИ 01.06.98, № 1698-B98.- С.1-10.

5. **Салихова З.З.**, Соколова Р.Б., Юсупова Д.В. Дезоксирибонуклеаза *Proteus mirabilis*/ Тез. Докл. II Всеросс. Конф. "Гомеостаз и инфекционный процесс", Саратов, 1998.- С.62.

6. Сафина Д.Р., **Салихова З.З.** Щелочная фосфатаза *Proteus mirabilis*/ Материалы Международн. конф. студентов и аспирантов "Ломоносов - 2000", Москва, 2000.- С.63.

7. **Салихова З.З.**, Соколова Р.Б., Юсупова Д.В. Биосинтез нуклеазы *Proteus mirabilis*// Статья принята в печать в журнал "Микробиология", будет опубликована в №6 2000 г.

8. **Салихова З.З.**, Соколова Р.Б., Пономарева А.З., Юсупова Д.В. Эндонуклеаза *Proteus mirabilis*// Статья принята в печать в журнал "Прикладная биохимия и микробиология", будет опубликована в №2 2001 г.

9. **Салихова З.З.**, Соколова Р.Б., Юсупова Д.В. Фосфатаза *Proteus mirabilis*// Статья принята в печать в журнал "Прикладная биохимия и микробиология", будет опубликована в №3 2001 г.

Соискатель

 Салихова З.З.

2-00

Подписано в печать 11.09.2000. Формат 60/84/16.
Усл. печ. л. 1,25. Договор № 18. Тираж 80.

Лаборатория оперативной печати ТГГИ.
420036, г. Казань, ул. Побежимова 47а, тел. 544373